

**Enzymes prodn. by fermentation of Ciliates - in high cell density fermentation using medium contg. particulate nutrients**

Patent Number: DE4238842

Publication date: 1994-05-19

Inventor(s): TIEDTKE ARNO PROF DR (DE); KIY THOMAS DIPL BIOL (DE)

Applicant(s):: TIEDTKE ARNO PROF DR (DE); KIY THOMAS DIPL BIOL (DE)

Requested  
Patent: ☐ DE4238842Application  
Number: DE19924238842 19921117Priority Number  
(s): DE19924238842 19921117IPC C12P1/00 ; C12N1/10 ; C12N9/16 ; C12N9/48 ; C12N9/24 ; C12N9/38 ; C12N9/40 ;  
Classification: C12P7/66 ; C12Q1/00 ; A61K7/42EC Classification: C12N1/10, A61K7/42S

Equivalents:

---

**Abstract**

---

Process for high cell density fermentation of ciliates (species : Tetrahymena, Colpidium) in axenic medium, esp. for recovery of secreted natural substances, whereby the Ciliates are supplied with a cheap nutrient medium that contains the nutrient substances in predominantly particulate form, while the spent nutrient medium, enriched with useful natural substances, is recovered via a polypropylene membrane system with simultaneous retention of the cells in the fermentation vessel.

USE/ADVANTAGE - The process is useful for technical scale prodn. of enzymes (useful in diagnostic procedures, food technology, analysis and molecular biology), melanin (which due to its UV absorbing characteristics is useful in the prodn. of sun protection creams) and extrusions. The process gives rapid cell multiplication to cell densities of over  $2 \times 10^7$  cells/ml (corresponding to a dry mass of 50 g/l) to give high rates of prodn. of useful natural prods., and the same cells can be used over long periods of continuous prodn. without use of complex methods for separating the cells from the medium.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 38 842 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 42 38 842.2  
㉑ Anmeldetag: 17. 11. 92  
㉒ Offenlegungstag: 19. 5. 94

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 P 1/00**  
C 12 N 1/10  
// C 12 N 9/16, 9/48,  
9/24, 9/38, 9/40, C 12 P  
7/66, C 12 Q 1/00,  
A 61 K 7/42

DE 42 38 842 A 1

㉓ Anmelder:  
Tiedtke, Arno, Prof. Dr., 4400 Münster, DE; Kiy,  
Thomas, Dipl.-Biol., 4400 Münster, DE

㉔ Erfinder:  
gleich Anmelder

⑥4 Hochzelldichte Fermentation von Ciliaten zur Gewinnung von Naturstoffen

DE 42 38 842 A 1

Es ist bekannt, daß einige Ciliatenspezies, wie etwa Tetrahymena, bestimmte Enzyme in das umgebende Medium sezernieren (Müller, 1972). Die sezernierten Enzyme wurden bisher nur im Labormaßstab gewonnen, wobei einfache batch-Fermentationen durchgeführt wurden. Dabei werden z. B. 500-ml-Erlenmeyerkolben, die 130 ml frisches Medium enthalten, mit Zellen angeimpft (Blum, 1975). Nach dem Erreichen der Stationärphase werden die Zellen durch Zentrifugationsschritte von dem enzymhaltigen Medium abgetrennt. Bisher wurden Zuchtmedien verwendet, die sich z. B. aus Proteose Pepton und Hefe Extrakt oder Leber Extrakt zusammensetzen und die Nährstoffe in überwiegend gelöster Form enthalten. Bei dem beschriebenen Verfahren liegt die maximale Zellkonzentration unter  $10^6$  Zellen/ml (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973) und die Generationszeit bei über 2 h, wenn etwa Tetrahymena thermophila fermentiert wird. Die maximalen Enzymausbeuten betragen z. B. 100 mU  $\beta$ -Hexosaminidase und saure Phosphatase pro ml Medium. Obwohl man weiß, daß Ciliaten wie z. B. Tetrahymena ein besseres Wachstum aufweisen, wenn die Nährstoffe in partikulärer statt gelöster Form vorliegen (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973), wurde solch ein axenisches Zuchtmedium bisher nicht beschrieben.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, daß die Ciliaten sich bei den bisher verwendeten Zuchtverfahren und -medien relativ schlecht vermehren ließen, woraus niedrige Ausbeuten bezüglich der Biomasse und wertvoller sezernierter Naturstoffe wie Enzyme, Melanine und Extrusomen resultierten. Weiterhin mußten die Zellen bisher in arbeitsaufwendigen Zentrifugations- bzw. Filtrationsschritten vom enzymhaltigen Kulturmedium abgetrennt werden.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß Ciliaten der Gattungen Tetrahymena und Colpidium sich sehr schnell vermehren (Generationszeit: 1,4 h) und Zelldichten von über  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (entspricht einer Trockenmasse von etwa 50 g/l) erreichen, wodurch eine enorm hohe Produktivität bezüglich der sezernierten Substanzen gegeben ist. Der kontinuierliche Austausch des Kulturmediums über ein Membransystem, das die Zellrückhaltung im Fermenter gewährleistet, ermöglicht es kontinuierlich über Monate große Mengen an Enzymen, Melaninen und Extrusomen zu gewinnen. Weitere Vorteile sind, daß dieselben Zellen über einen langen Zeitraum zur Produktion genutzt werden können, und daß aufwendige Arbeitsschritte zur Abtrennung des Mediums von den Zellen entfallen. Das gute Wachstum (und somit die hohen Ausbeuten) wird durch den Einsatz eines Kulturmediums, das im Gegensatz zu den bisher üblichen axenischen Medien die Nährsubstanzen überwiegend in partikulärer Form enthält, ermöglicht. Dies wird erreicht durch die Verwendung von Magermilchpulver als Nährsubstrat. Durch Autoklavieren des Mediums wird bewirkt, daß das Milcheiweiß koagulierte und aus der löslichen in die partikuläre Form übergeht. Dieses Kulturmedium enthält im wesentlichen Magermilchpulver und kostet somit nur Bruchteile des bislang verwendeten PPYS Mediums, was als Vorteil für eine kommerzielle Nutzung des Systems gesehen werden muß.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist dem beigelegten Manuskript einer Publikation, die am 19.11.92

## Literatur

- 5 Blum, J. J. (1975) Effects of Metabolites Present During Growth of Tetrahymena pyriformis on the Subsequent Secretion of Lysosomal Hydrolases. J. Cell. Physiol. 86: 131—142.
- 10 Müller, M. (1972) Secretion of Acid Hydrolases and its Intracellular Source in Tetrahymena pyriformis. J. Cell Biol. 52 : 478—487.
- Rasmussen, L. and Modeweg-Hansen, L. (1973) Cell multiplication in Tetrahymena cultures after addition of particulate material. J. Cell Sci. 12 : 275—286.

## Ausbeuten

- 15 1 ml zellfreier Überstand aus unserem Verfahren enthält ca. 25000 mU saure Phosphatase und 14000 mU  $\beta$ -Hexosaminidase, während 1 ml zellfreier Überstand aus herkömmlichen batch-Verfahren nur etwa 100 mU beider Enzyme enthält. Ähnliche Verhältnisse findet man bei allen weiteren Enzymen. Für 50000 mU  $\beta$ -Hexosaminidase (aus Rinderniere) der Fa. Boehringer Mannheim zahlt man 274,- DM und für 60000 mU saure Phosphatase 70,- DM. Weiterhin lassen sich mit unserem System große Mengen PDE I, die heute noch aus Schlangengiften gewonnen wird, PDE II, Protease, alpha-Mannosidase, alpha-Glucosidase,  $\beta$ -Glucosidase, Phospholipase C, Phospholipase A<sub>1</sub> u. a. Enzyme produzieren (siehe auch Abb. 1). Durch den Einsatz geeigneter Mutanten konnten außerdem große Mengen Melanin gewonnen werden.

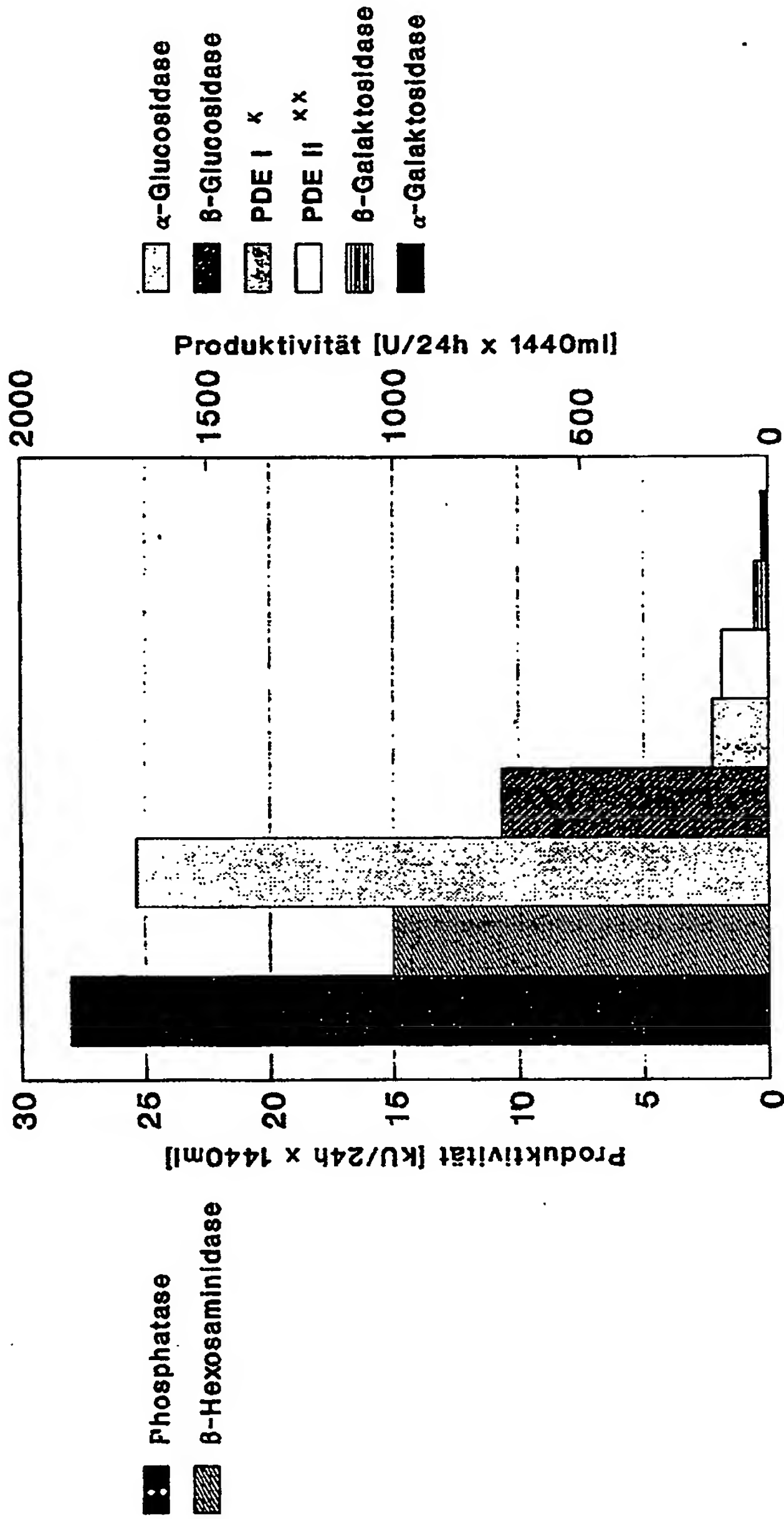
## Anwendungsbeispiele

- Die genannten Enzyme sind von kommerzieller Bedeutung und finden Verwendung in Bereichen der Diagnostik, Lebensmittelchemie, Analytik und Molekularbiologie. Da geeignetere Quellen bisher nicht zur Verfügung standen, wird die PDE I z. B. noch aus Schlangengift, die PDE II aus Kalbsmilk, die  $\beta$ -Hexosaminidase aus Rinderniere und die  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln gewonnen. Melanine werden aufgrund ihrer Eigenschaft, UV Strahlen zu absorbieren, zur Herstellung von Sonnenschutzcremes eingesetzt.

## Patentanspruch

Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von Ciliaten (Gattungen: Tetrahymena, Colpidium) auf axenischem Medium insbesondere zur Gewinnung von sezernierten Naturstoffen dadurch gekennzeichnet, daß die Ciliaten kontinuierlich mit einem billigen Nährmedium versorgt werden, das die Nährstoffe in überwiegend partikulärer Form enthält, während das mit wertvollen Naturstoffen angereicherte, verbrauchte Kulturmedium, bei gleichzeitiger Rückhaltung der Zellen im Zuchtgefäß, über ein Polypropylenmembransystem geerntet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



x PHOSPHODIESTERASE I (PDE I)  
xx PHOSPHODIESTERASE II (PDE II)

Abb. 1 :